

7/9/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

002278956

WPI Acc No: 1979-78165B/197943

**Coenzyme-Q prodn. by fermentation - of agrobacterium microorganism,
e.g.**

agrobacterium radiobacter ATCC 4718

Patent Assignee: KYOWA HAKKO KOGYO KK (KYOW)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 54119090	A	19790914				197943 B
JP 83057155	B	19831219				198403

Priority Applications (No Type Date): JP 7825040 A 19780307

Abstract (Basic): JP 54119090 A

Prodn. of coenzyme Q10 comprises culturing a microorganism
belonging to Agrobacterium and having ability to produce coenzyme
Q10

and which does not induce bark hypertrophy in a medium contg.
carbon

source, nitrogen source, inorganics and other nutrients.

In an example, Agrobacterium radiobacter ATCC 4718 seed culture
(30

degrees C, 24 hr., 250 ml) was inoculated and cultured in 3 L
medium

(pH 7.2, adjusted with ammonia) contg. 5 g/dl glucose, 1 g/dl
ammonium

sulphate, 0.05 g/dl KH2PO4, 0.05 g/dl K2HPO4, 0.025 g/dl MgSO4.
7H2O, 2

g/dl corn steep liquor and 2 g/dl CaCO3, at 30 degrees C for 30
hr.,

600 rpm and 3 l/min. aeration to accumulate 26 mg/L CoQ10 and <=0.2
mg/L CoQ8 + CoQ9. The resultant culture (2 l) was centrifugated to
give

41 g (dry) mycelia, which were suspended in 150 ml water and
reductively saponified in presence of 400 ml methanol, 80 g NaOH
and 15

g pyrogallol at 85 degrees C for 40 min. The reaction. mixt. was
extd.

twice with n-hexane and the extract was dissolved in 40 ml acetone.
The

soln. was conc. to 10 ml and chromatographed over silica gel with
benzene. The active fraction was concentrated, dissolved in 5 ml
ethanol and chilled to give 13 mg yellow crude crystals.

Title Terms: COENZYME-Q; PRODUCE; FERMENTATION; AGROBACTERIUM;
MICROORGANISM; AGROBACTERIUM; RADIOBACTER; ATCC

Derwent Class: B05; D16

International Patent Class (Additional): C12D-003/02; C12D-013/10;
C12P-007/66; C12R-001/01

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B02C1; D05-C03

Chemical Fragment Codes (M1):

01 V800 G100 M531 L951 H541 H542 H711 H722 H723 M240 M232 M233 M331

BEST AVAILABLE COPY

M333 N130 M510 M520 M540 M720 M414 M902

Chemical Fragment Codes (M2):

02 K0 H5 H7 M282 M210 M211 M226 M231 M232 M240 M270 M311 M316 M320
G100

M531 L951 H541 H542 H711 H722 H723 N130 M510 M520 M540 M720 M414
M902

?

⑫公開特許公報 (A)

昭54-119090

⑤Int. Cl.²
C 12 D 3/02
C 12 D 13/10

識別記号 ⑥日本分類
36(2) D 33
36(2) C.04

庁内整理番号 ④公開 昭和54年(1979)9月14日
7822-4B
7421-4B

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 4 頁)

⑤発酵法によるコエンチーム Q₁₀の製造法

②特 願 昭53-25040

②出 願 昭53(1978)3月7日

⑦発 明 者 古屋晃

川崎市多摩区高石1495-24

同 荒木和美

町田市山崎町2130番地

⑦発 明 者 好田肇

相模原市磯部143-2

同 小谷幸亘

相模原市鶴の森350-2 リリ

エンハイム C-810

⑩出 願 人 協和醗酵工業株式会社

東京都千代田区大手町一丁目6
番1号

明 細 書

1. 発明の名称

発酵法によるコエンチーム Q₁₀ の製造法

2. 特許請求の範囲

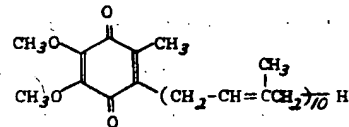
アグロバクテリウム属に属し、植物体に対する樹皮肥大誘引活性がなくかつコエンチーム Q₁₀ を生成する能力を有する微生物を、炭素源、窒素源、無機物、その他の栄養物を程よく含む培地に培養して培養物中にコエンチーム Q₁₀ を蓄積せしめ、該培養物からコエンチーム Q₁₀ を採取することを特徴とするコエンチーム Q₁₀ の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は発酵法によるコエンチーム Q₁₀ (以下 CoQ₁₀ と略称する) の製造法に関するものである。さらに詳しくはアグロバクテリウム属に属し、植物体に対する樹皮肥大誘引活性がなくかつ CoQ₁₀ を生成する能力を有する微生物を栄養培地に培養して、培養液および菌体中に CoQ₁₀

を生成せしめこれを採取することを特徴とする発酵法による CoQ₁₀ の製造法に関するものである。その目的とするところは、医薬品として広い用途をもつ CoQ₁₀ の新規な製造法を提供することにある。

CoQ₁₀ は下式で示される化合物であり、比較的多種類の微生物の菌体中に含まれていることが知られている。



従来、微生物を用いる発酵法による CoQ₁₀ の製造法としては、各種の酵母類を培養する方法 (特公昭48-8836, 48-25317, 51-19034, 特開昭53-105288) あるいはロドシュードモナス (特公昭47-7754, 特公昭48-21519)、アルカリゲネス (特公昭51-19034)、シュー

ドモナス(特公昭36-14293, 特開昭52-44290, 52-47990)、プロテウス(特公昭36-14293)らの各属の細菌類を用いる方法が知られている。しかしながら、これらの方法ではいずれもCoQ₁₀生成量が低くまだ満足すべきものではない。

本発明者らは、さらにすぐれた発酵法によるCoQ₁₀の製造法について種々検討した結果、アグロバクテリウム属に属し、植物体に対する樹皮肥大誘引活性を有しないCoQ₁₀生成菌を用いることにより工業的に有利にCoQ₁₀を製造できることを見出した。従来、アグロバクテリウム属の細菌がCoQ₁₀を含むことについては、植物がんの一種である、植物樹皮の肥大を誘導する活性の強いアグロバクテリウム・ツメファシエンシスN・C・T・C 397あるいはアグロバクテリウム・ツメファシエンシスB₆らの菌株の菌体中に乾燥重量1g当り600μg程度のCoQ₁₀が、CoQ₉およびCoQ₈と共に含まれることが知

られている(Biochem. J. 1969年; Arch. Biochim. Biophys. 1966年)が、これをCoQ₁₀の工業生産に利用する試みはなされていない。

その主な理由は、CoQ₁₀の生成量が低いこと、他のCoQ^族同体(CoQ₉およびCoQ₈)が副生産されてCoQ₁₀との分離が困難であることの他に、この種の植物病原性菌を、大規模に菌体を取扱う工業生産に使用することによつて農作物へ悪影響が生ずる可能性があるため、菌体の処理に手数がかゝるなどの理由があげられる。

1字加入

本発明者らは、これらの難点を克服するために、植物体の樹皮肥大誘引活性を有しない微生物の中から高収率にCoQ₁₀を生成する菌株の選択をおこなつた結果、非植物病原菌であるアグロバクテリウム・ラジオバクターに属する細菌および植物体に対する樹皮肥大誘引活性をもたない他のアグロバクテリウム属細菌の中に、著量のCoQ₁₀を生成し、CoQ₁₀以外のCoQ同族体を副生しない菌株を見出した。

アグロバクテリウム・ラジオバクターに属する微生物がCoQ₁₀を生成することはこれまでまったく知られておらずまた他のアグロバクテリウム属の非植物病原性菌をCoQ₁₀の発酵生産に使用した例はこれまでまったく知られておらず、本発明はかゝる新規な知見にもとづくものである。

本発明に使用する微生物としてはアグロバクテリウム属に属し、植物体に対して樹皮肥大誘引活性をもたないCoQ₁₀生産菌ならば野生株、変異株のいずれもが使用でき、代表例としてアグロバクテリウム・ラジオバクターATCC 4718, ATCC 6466, アグロバクテリウムsp. 0363, アグロバクテリウム・ツメファシエンシスIPO 417, ICPB TR6, NCPPB 1641をあげることができる。また、植物体に対し樹皮肥大誘引活性を持つアグロバクテリウム・ツメファシエンシスから誘導される非植物病原性の変異株も本発明に利用できる。

また、上記のアグロバクテリウム属の、植物体に対する樹皮肥大誘引活性のないCoQ₁₀生産

菌を親株として誘導される各種の薬剤(抗生物質、アミノ酸アナログ、核酸アナログ、ビタミンアナログ、サルファ剤、呼吸阻害剤、ステロール合成阻害剤ら)に対する耐性あるいは感受性の性質を持つた変異株、各種の栄養要求性変異株(アミノ酸要求性、核酸要求性、ビタミン要求性ら)、形態変異株、高分子物質合成能欠失変異株、カタボライトレプレッション耐性変異株、温度感受性株らも本発明に使用することができる。

なお、上記のアグロバクテリウム属細菌の菌学的性質についてはバージェイズ・マニュアル・オブ・デターミナティブ・バクテリオロジー第8版(1974)に記載されて公知であり、本発明はこの記載に準じておこなわれたものである。たゞし、このマニュアルの分類法にしたがえば、前述のアグロバクテリウム・ツメファシエンシスIPO 417, ICPB TR6, NCPPB 1641らは非植物病原菌であるために、アグロバクテリウム・ツメファシエンシスに分類す

るのは適当ではなく、アグロバクテリウム属の他の種に属せしめるべきであるが、これらの菌株に限り本発明の記載は分離者の命名に準じたものである。また、これらの菌株が根物体の樹皮肥大誘引活性をもたないことは文献（例えば、J. Gen. Microbiol., 78巻, 227頁, 1973年）に記載されて公知である。さらに、植物体に対する樹皮肥大誘引活性を持つ菌株から、樹皮肥大誘引活性をもたない変異株の誘導は公知の方法—例えばアクリジン色素処理、加熱処理らの方法により容易におこなうことができる。

本発明に使用する微生物の培養培地としては、炭素源、窒素源、無機物、その他の栄養物を程よく含有する培地ならば合成培地、天然培地のいずれもが使用できる。培地に使用する炭素源は、使用菌が利用可能なものならばいずれの種類を用いてもよい。すなわち、グルコース、フラクトース、シュクロース、蔗糖蜜、でんぷん、でんぷん可水分解物などの炭水化物、グリセリン、ソルビトールなどの糖アルコール、ア

スバラギン酸、グルタミン酸、リジン、アラニン、グリシンらのアミノ酸類、乳酸、ピルビン酸、酢酸、リンゴ酸、ギ酸、コハク酸、フマル酸、クエン酸、脂肪酸らの酸類、 α -パラフィンらの炭化水素類、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールらのアルコール類を単独あるいは組合せて使用できる。

使用菌が栄養要求性を示す場合にはその要求物質が培地に添加される。また、培地あるいは培養液中に各種の物質例えば核酸関連物質、アミノ酸類、ビタミン類、有機酸類、脂肪酸類、アルコール類、ステロール類、その他 CoQ₁₀ 生合成の前駆物質およびその関連化合物を培地に添加することにより CoQ₁₀ 生成量が増加する場合がある。

培養は振盪培養、通気攪拌培養などの好気的条件下でおこなわれる。培養中、培養液の pH は 5~7 程度が好適である。中和剤としてはアンモニア水、水酸化ナトリウム、水酸化カルシウム、炭酸カルシウム、リン酸マグネシウム、

水酸化カリウム、尿素らが用いられる。培養期間は通常 3~7 日間で、培養液および菌体中が蓄積するが、大部分は菌体中に蓄積する。培養液からの CoQ₁₀ の両方に CoQ₁₀ の単離は常法により溶媒抽出その他の操作によつておこなうことができる。

以下に実施例を示す。

実施例 1

グルコース 2 g/dl, ペプトン 1 g/dl, 酵母エキス 1 g/dl, 食塩 0.5 g/dl の組成よりなる pH 7.2 の種培地 300 ml を 2 l 容三角フラスコに入れて殺菌する。これに、アグロバクテリウム・ラジオパクター ATCC 4718 を接種し、30℃で24時間振盪培養する。該種培養液 250 ml を下記の組成の発酵培地 3 l を含む 5 l 容ジャーファーマンターに接種し、600 rpm の回転数、1 分間当り 3 l の通気、温度 30℃の培養条件下で 30 時間通気攪拌培養した時培養液 1 l 当り 2.6 mg の CoQ₁₀ が生成し CoQ₈ と CoQ₉ の副生産量は 0.2 mg 以下であつた。発酵培地の組成：グルコース 5 g/dl, 硫酸アンモニウム 1 g/dl, リン酸一カリウム 0.05 g/dl,

リン酸二カリウム 0.05 g/dl, 硫酸マグネシウム・7 水塩 0.025 g/dl, コーン・ステープ・リカー 2 g/dl, 炭酸カルシウム 2 g/dl (pH は殺菌前にアンモニア水で 7.2 に調整する)。

培養液 2 l を遠心分離して乾燥重量として 41 g に相当する湿菌体をえた。これを 150 ml の水に懸濁後、メタノール 400 ml, 水酸化ナトリウム 80 g, ピロガロール 15 g を加え 85℃で 40 分間還元ケン化後放冷し、1 l ずつの n-ヘキサンを加えて 2 回抽出操作をおこなう。n-ヘキサン層を集めてこれに無水芒硝を加えて脱水後減圧下で濃縮し残渣を 40 ml のアセトンに溶解し、不溶物を分別除去した後、再び濃縮し、残渣を 10 ml のアセトンに溶解後シリカゲルカラムに流しベンゼンにて溶出する。CoQ₁₀ を含む分画を集めて濃縮し残渣を 5 ml のエタノールに溶解した後冷却することにより黄色の CoQ₁₀ の粗結晶 1.3 mg を得た。本品からさらにエタノールで再結して得た結晶は逆相薄層クロマトグラフィーの R_F 値、高速液体クロマトグ

ラフィーのリテンション点、融点、核磁気共鳴スペクトル、元素分析値、赤外線吸収スペクトル、紫外線吸収スペクトル曲線がCoQ₁₀のそれと一致した。

実施例2

実施例1と同一組成の種培地20mlを含む300ml容三角フラスコに、第1表に示すアグロバクテリウム・ラジオバクターの菌株を接種し、210rpmの回転数、30℃の培養温度条件下でロータリーシェーカー上で24時間振盪培養する。えられた種培養液2mlを実施例1で用いたと同一組成の発酵培地20mlを含む300ml容三角フラスコに接種して、種培養と同様に30時間振盪培養した。各菌株のCoQ₁₀生成量は第1表に示すとおりである。

第 1 表	
使 用 菌	CoQ ₁₀ 生成量(mg/g)
アグロバクテリウム・ラジオバクター	
ATCC 4718	20
ATCC 6466	18

実施例3

使用菌として、第2表のアグロバクテリウム・ツメファシエンズの植物体に対する樹皮肥大誘引活性のない菌株を用いた他は実施例2と同様に実施した結果は第2表のとりのCoQ₁₀が生成した。

第 2 表	
使 用 菌	CoQ ₁₀ 生成量(mg/g)
アグロバクテリウム・ツメファシエンズ	
IPO 417	19
ICPB TR 6	16
NCPB 1641	14

実施例4

使用菌として、アグロバクテリウム・ツメファシエンズATCC 4452(植物体に対する樹皮肥大誘引活性のある菌株)から誘導した非植物病原性菌NP-1を用いる他は実施例2と同様に実施した結果26mg/gのCoQ₁₀が生成した。

特許出願人 (102)協和醗酵工業株式会社
代表者 高 田 弘

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.